

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-327595

(43)Date of publication of application : 13.12.1996

(51)Int.Cl.

G01N 27/447

C07H 21/04

C12M 1/00

C12N 15/09

C12Q 1/68

G01N 33/50

(21)Application number : 07-152401

(71)Applicant : TOYO ROSHI KAISHA LTD

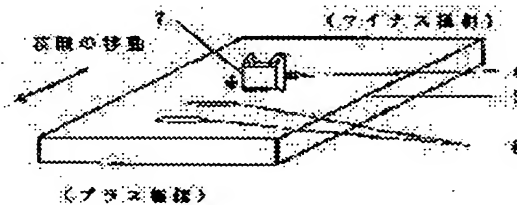
(22)Date of filing : 26.05.1995

(72)Inventor : WATANABE MASAYUKI

**(54) METHOD FOR RECOVERING NUCLEIC ACID FROM ELECTROPHORETIC GEL AND NUCLEIC ACID RECOVERY CHIP USED THEREFOR****(57)Abstract:**

**PURPOSE:** To provide a nucleic acid recovery chip, for easily recovering target nucleic acid from an agarose gel in a short time as a recovered solution of a high concentration, high purity, and high recovery rate after the nucleic acid is electrophoresed in the agarose gel, and a nucleic acid recovery method using the same.

**CONSTITUTION:** This nucleic acid recovery chip 7, which comprises a film having a bore that allows passage of nucleic acid and having no or almost no nucleic acid adsorptivity, another film having a bore that does not allow passage of nucleic acid and having no or almost no nucleic acid adsorptivity, and a nucleic acid recovery chamber provided between the films, is plugged into the plus terminal side near a target nucleic acid band 4 contained in an agarose gel 5, with a buffer solution injected into the recovery chamber in advance and with the film of the chip 7 that does not allow passage of nucleic acid facing the plus side, and the target nucleic acid is recovered into the buffer solution in the nucleic acid recovery chamber through electrophoresis.

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

BEST AVAILABLE COPY

Doc Ref. AL1  
Int'l. Appl. No. PCT/JP2003/015132

[Number of appeal against examiner's decision  
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-327595

(43)公開日 平成8年(1996)12月13日

(51)Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 27/447			G 0 1 N 27/26	3 1 5 C
C 0 7 H 21/04			C 0 7 H 21/04	B
C 1 2 M 1/00			C 1 2 M 1/00	A
C 1 2 N 15/09		9453-4B	C 1 2 Q 1/68	Z
C 1 2 Q 1/68			G 0 1 N 33/50	P

審査請求 未請求 請求項の数3 F D (全 7 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平7-152401

(22)出願日 平成7年(1995)5月26日

(71)出願人 000223045

東洋濾紙株式会社

東京都中央区日本橋本町3丁目2番13号

(72)発明者 渡辺 昌幸

栃木県宇都宮市江曾島本町22-3 東洋濾紙

株式会社技術センター内

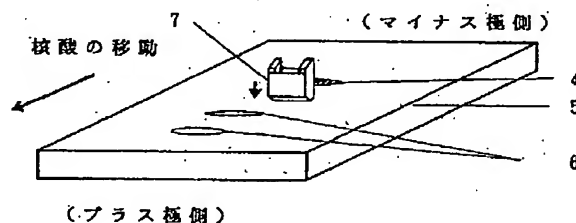
(74)代理人 弁理士 福田 尚夫

(54)【発明の名称】 電気泳動ゲルからの核酸回収方法及びそれに用いる核酸回収チップ

(57)【要約】

【目的】 核酸をアガロースゲルにて電気泳動後、このアガロースゲルから直接目的核酸を短時間に、高濃度、高純度、高回収率の回収液としてより簡便に回収を行うための核酸回収チップ及びこれを用いた核酸回収方法を提供する。

【構成】 核酸を通過させる孔径を有し且つ核酸の吸着性が全くないか又はほとんどない膜3と、核酸を通過させない孔径を有し且つ核酸の吸着性が全くないか又はほとんどない膜1を用い、これら両膜3、1間に核酸回収室8を設けて成る核酸回収チップ7を、その回収室8内にあらかじめ緩衝液を注入した状態で、アガロースゲル5に含まれる目的核酸バンド4附近のプラス極側に、チップ7の核酸を通過できない膜1側をプラス側に向けて差し込み、再び電気泳動によって目的核酸を核酸回収室8の緩衝液に回収する核酸回収方法及び前記構成の核酸回収チップ7である。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 核酸を通過させる孔径を有し且つ核酸の吸着性が全くないか又はほとんどない膜(3)と、核酸を通過させない孔径を有し且つ核酸の吸着性が全くないか又はほとんどない膜(1)を用い、これら両膜

(3)、(1)間に核酸回収室(8)を設けて成る核酸回収チップ(7)を、前記回収室(8)に緩衝液を注入させた状態で、アガロースゲル(5)に含まれる目的核酸バンド(4)附近のプラス極側に、前記チップ(7)の核酸を通過できない膜(1)側をプラス側に向けて差し込み、再び通電し電気泳動することによって目的核酸を核酸回収室(8)の緩衝液に回収することとを特徴とする核酸回収方法。

【請求項2】 核酸を通過させる孔径を有し且つ核酸の吸着性が全くないか又はほとんどない膜(3)と、核酸を通過させない孔径を有し且つ核酸の吸着性が全くないか又はほとんどない膜(1)を用い、これら両膜

(3)、(1)間に核酸回収室(8)を設けて構成される請求項1の核酸回収方法の実施に使用する核酸回収チップ。

【請求項3】 両膜(3)、(1)間に支持体(2)を介して核酸回収室(8)を設けて構成される請求項2の核酸回収方法の実施に使用する核酸回収チップ。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、電気泳動ゲルからの核酸(DNA及びRNA)の回収方法及びその方法の実施に直接使用する核酸回収チップに関する。さらに詳しくは、核酸をアガロースゲルにて電気泳動後、幾つかの核酸から目的核酸のみを高純度、高濃度の核酸回収液として簡便に回収するための方法及びその実施に使用するチップに関する。

## 【0002】

【従来の技術】核酸は、アガロースゲルもしくはアクリルアミドゲルにて電気泳動を行うことにより、分子量の違いから異なるバンドとして分離することができ、種々の長さの核酸から目的核酸を見つけることができる。この電気泳動後のゲルから、目的核酸のみを回収することを狙いとして、これまでに以下の(イ)～(ホ)の方法が知られている。

## 【0003】(イ)ゲル粉碎法

目的核酸を含むゲル片を粉碎して、これに緩衝液を加えて数時間振とうしながら溶出させ、その後濾過することによってゲル片を除き、回収する方法(添田栄一著、生物化学実験法18"核酸の塩基配列決定法",第32-33頁,学会出版センター)。

## 【0004】(ロ)電気泳動による溶出法

一端を閉じた透析チューブに目的核酸を含むゲル片を緩衝液とともに入れてもう一端を閉じ、このチューブを電気泳動槽内に電極と平行となるように置き、数時間通電

を行うことによって回収する方法(高木康敬編著、遺伝子操作マニュアル、講談社サイエンティフィック)。

## 【0005】(ハ)ガラスビーズを用いる方法

目的核酸を含むゲル片をヨウ化カリウムや過塩素酸ナトリウムで融解し、ガラスビーズを加えて核酸を吸着させた後に、エタノールで数回洗浄し、緩衝液を加えて溶出する方法(添田栄一著、生物化学実験法18"核酸の塩基配列決定法",第34頁,学会出版センター)。

## 【0006】(ニ)低融点アガロースを用いる方法

目的核酸を含むゲル片を65℃で融解し、緩衝液を加えてフェノール抽出を数回行うことによって回収する方法(添田栄一著、生物化学実験法18"核酸の塩基配列決定法",第33-34頁,学会出版センター)。

## 【0007】(ホ)電気的にゲルから直接溶出する方法

緩衝液と電極の入った容器の開口部に透析膜をつけ、これに接する微量の緩衝液の入る回収室をもつプラス極側を目的核酸バンドの上面に接触させ、アガロースゲルの底面にマイナス電極を配置させ、通電を行うことで回収する方法(実開平5-88296、Ohyama, ANALYTICAL BIOCHEMISTRY,第208巻,第209-211頁,1993年)。

## 【0008】

【発明が解決しようとする課題】これら従来の方法である(イ)ゲル粉碎法、(ハ)ガラスビーズを用いる方法、(ニ)低融点アガロースを用いる方法は、ゲルを粉碎又は融解して核酸を溶出するため、硫化物が回収液中に含まれてきてしまい、回収後の操作である酵素反応を阻害し、反応効率を低下させる原因となっている。

(ロ)電気泳動による溶出法については、回収時間(設置、通電、回収)が数時間と長く手間がかかり、また回収液量が多くなり低濃度の核酸しか得られない。また

(ホ)電気的にゲルから直接溶出する方法では、設置(透析膜の付け替え、回収室への微量緩衝液の注入)に時間と手間がかかり、また直接マイナス電極がゲル底面に接するため電極から気泡が生じて、回収室とゲルとの間に気泡が入り通電を停止させてしまうことになる。またこの方法では、電気泳動後のアガロースゲルから直接目的核酸を溶出させるため、近接する他のバンドも回収してしまう虞がある。

【0009】以上のように、従来の技術はいずれも、アガロースゲルから目的核酸を高濃度、高純度、高回収率で緩衝液に回収し、かつ短時間に、簡便さを兼ね備えた方法とは言えなかった。本発明では、これらの要件を兼ね備えた核酸の回収を行うための方法及びその実施のためのチップを提案する。

## 【0010】

【課題を解決するための手段】本発明は、上記目的を達成するため、核酸を通過させる孔径を有し且つ核酸の吸着性が全くないか又はほとんどない膜3と、核酸を通過させない孔径を有し且つ核酸の吸着性が全くないか又は

ほとんどない膜 1 を用い、これら両膜 3、1 間に核酸回収室 8 を設けて成る核酸回収チップ 7 を、前記回収室 8 に緩衝液を注入させた状態で、アガロースゲル 5 に含まれる目的核酸バンド 4 附近のプラス極側に、前記核酸を通過できない膜 1 側をプラス側に向けて差し込む。そして、再び通電し電気泳動することによって目的核酸を核酸回収室 8 の緩衝液に回収することを特徴とする核酸回収方法である。

【0011】また、核酸を通過させる孔径を有し且つ核酸の吸着性が全くないか又はほとんどない膜 3 と、核酸を通過させない孔径を有し且つ核酸の吸着性が全くないか又はほとんどない膜 1 を用い、これら両膜 3、1 間に核酸回収室 8 を設けて構成される、核酸回収方法の実施に使用する核酸回収チップ 7 である。さらに上記構成中、両膜 3、1 間に支持体 2 を介して核酸回収室 8 を設けて構成される、核酸回収方法の実施に使用する核酸回収チップ 7 である。

【0012】

【実施例】即ち、本発明は核酸を通過させることのできる孔径を持つ膜 3 と核酸を通過させない孔径を持つ膜 1 の二種類の膜を支持体 2 を介して核酸回収室 8 を設けたチップ 7 を用いて、電気泳動後のアガロースゲル 5 から直接目的核酸を支持体 2 を介して両膜 3、1 間の緩衝液に電気的にかつ回収専用の装置を用いることなく短時間に、しかも簡単に回収する方法、仕組である。以下、その好ましい態様についてさらに詳しく説明する。

【0013】本発明に係るチップ 7 の形状としては、上記性質の異なる二種類の膜 3、1 が核酸を泳動する方向に相対して設けられることにより構成される（図 2、3 参照）。この性質の異なる二種類の膜 3、1 を保持する側面の支持体 2 の材質は特に規制はない。また、支持体 2 と二種類の膜 3、1 の接着方法は、熱溶着や接着剤を用いた方法が挙げられるが、特に規制はない。なお、前記支持体 2 を介設しないで膜自体の硬度を利用して折曲げ加工することによりチップを形成することもできる（図 4 の（イ）、（ロ））。また、両膜 3、1 間に存在する隙間を核酸回収室 8 とするため、この回収室に注入する緩衝液の量は、支持体 2 の厚さと断面積に依存する。支持体 2 の厚さとしては、回収時にマイクロビベットが挿入できる隙間以上であり、アガロースゲル 5 の目的核酸バンド付近にチップ 7 を突き刺す時に目的以外の核酸バンドに触れない程度の厚さであれば良い。好ましくは、支持体 2 の厚さは 0.3～0.6 mm である。

【0014】このチップ 7 を構成する核酸を通過させることのできる膜 3 の好ましい形態は、異物（アガロースゲル片）の混入を防ぎ、チップ 7 をアガロースゲル 5 から出し入れする時に緩衝液の急激な流入を防ぎ、核酸吸着性のない又は吸着性のほとんどない特徴を持つ膜である。これに適する膜として濾紙、精密濾過膜、限外濾過膜等が挙げられる。しかし、耐久性や溶出物による汚

染等を考慮した場合、医薬品等の濾過に用いられる精密濾過膜が最も好ましい。核酸吸着性のない又は吸着性のほとんどない膜の材質例として、セルロースアセテート製精密濾過膜を用いることができる。さらにこの精密濾過膜の孔径としては特に規制はないが 0.2～1.0 μm が好ましい。この孔径は現在市場に出ている主な膜のものであり、この範囲外でもチップ 7 に用いて核酸を回収することは可能である。

【0015】またこのチップ 7 を構成する核酸を通過できない膜 1 の好ましい形態としては、核酸等の高分子を捕捉し、イオンや低分子を通過させ、核酸吸着性のない又は吸着性のほとんどない膜である。この目的核酸が通過できない膜としては一般に透析に用いられている膜が挙げられる。材質としては特に規制はないが、再生セルロース膜等を用いることができる。

【0016】種々の長さの核酸を含むサンプルをアガロースゲル 5 にて電気泳動後このアガロースゲル 5 をエチジウムブロミドで染色したものから、チップ 7 を用いて目的核酸を回収する場合、始めにチップ 7 の回収室 8 に緩衝液を注入しておき、UV 照射（トランスイルミネーター又は紫外線ランプ）下で目的核酸バンド 4 を確認しながら、チップ 7 の核酸を通過できない膜 1 側（図 2、3 参照）をプラス側に向けて、目的核酸バンド 4 のプラス極側に、チップ 7 がバンド 4 と平行になるように、且つチップ 7 の先端がアガロースゲル 5 の底面に達するまで（図 1、3 参照）突き刺す。

【0017】その後、このアガロースゲル 5 を再び電気泳動装置にセットし、適当な電圧、時間で通電を行う。この操作により、目的核酸はまず、核酸を通過させることのできる膜 3 を通り抜け、回収室 8 の緩衝液に移動し、その後核酸を通過させることのできる膜 1 で移動が停止する。次に電流の向きを逆にして数秒間通電を行い、透析膜に付着した目的核酸を剥がす。これは、目的核酸の回収量を増加させるための操作である。最後に、アガロースゲル 5 からチップ 7 を取り除き、先の細いマイクロビベット等を用いてチップ 7 の回収室 8 から緩衝液を吸い取り、目的核酸を回収するものである。

【0018】回収に要する時間は、目的とする核酸の長さによって異なり、2 kbp 以下では約 1 分、5 kbp 程度であれば約 4 分、10 kbp 以上では 8 分以上必要になってくる。よって、それぞれの核酸の長さによって回収時間を変えて行うことが好ましい。回収に要する電圧は、アガロースゲルを電気泳動する装置によって異なり、特に規制はない。しかし、低い電圧で回収を行った場合、回収に要する時間は長くなる。

【0019】本発明に係るチップ 7 を用いることにより、緩衝液に回収するため回収液は、核酸濃度が高く、さらに透析膜を用いているため、悪影響を及ぼす硫化物の含有がほとんどない。また目的核酸バンド 5 に接して差し込むため、目的以外の核酸の混入を防ぐことができ

る。以下、本発明の試験例を幾つか挙げる。

【0020】

【試験例1】

<回収するサンプルの調製>  $\lambda$  DNA/Hind III digest のサンプル (株式会社ニッポンジーン製 Marker 1) 1.0  $\mu$ g を 0.7% アガロースゲルによって、100V、40min、TBE (トリスホウ酸) 緩衝液で電気泳動を行い、その後このゲルをエチジウムブロミド染色しUV照射 (トランスイルミネーター) 下でサンプルの存在を確認した (23,9.42,6.56,4.36,2.32,2.02,0.56,0.13kbpの核酸)。

【0021】<回収方法> サンプルを電気泳動することによって確認された8種類の核酸バンドの中から、目的核酸バンドを6.56kbとし、本発明チップを用いてこの核酸の回収を行った。始めにチップの回収室にTBE緩衝液20 $\mu$ lを注入しておき、UV照射下で目的核酸バンドを確認しながらチップの透析膜側をプラス極側に向けて、バンドのプラス側にチップがバンドと平行になるように、チップの先端がゲルの底に達するまで突き刺した (図1、3参照)。その後、このアガロースゲルを100V、4min再び通電を行い、次に電流の向きを逆にして5秒間通電を行った。これは、透析膜に付着した目的核酸を剥がし、回収量を増加させるためである。アガロースゲルからチップを取り除き、先の細いマイクロピペットで回収室の緩衝液を数回出し入れした後 (ピペッティング)、緩衝液を全量吸い取り回収液とした。なお、チップに用いた膜はセルロースアセテート膜 (東洋濾紙株式会社製、C045A、孔径0.45 $\mu$ m) と透析膜 (フナコシ株式会社製、CELLU-SEP T3, MWCO5,000) であり、支持体はPETフィルムを用いた。

【0022】<結果> 上記方法で得られた回収液を高速液体クロマトグラフィーで測定したところ、回収した核酸の収率は、92%であった。なお、回収液に目的核酸以外の核酸の混入は見受けられなかった。

【0023】

【試験例2】試験例1と同様の操作で回収を行い、目的核酸を4.36kbとした。但し、回収時間を3分に変えて行った。回収した核酸の収率は、90%であった。

【0024】

\*

\*【試験例3】試験例1と同様の操作で回収を行い、但し、緩衝液をTBEからTAE (トリス酢酸) に変えて行った。回収した核酸の収率は、87%であった。

【0025】

【発明の効果】本発明は、以上のように、核酸を通過させることのできる孔径を持つ膜3と核酸を通過させない孔径を持つ膜1の二種類の膜にて核酸回収室8を設けたチップ7を用いて、電気泳動後のアガロースゲル5から直接目的核酸を両膜3、1間の緩衝液に電気的にかつ回収専用の装置を用いることなく回収する仕組みであり、目的核酸バンドに近接して核酸回収チップ7をゲルに差し込むので、非常に簡便で、短時間回収が可能となった。緩衝液に回収された回収液は、核酸濃度が高く、また透析膜を用いているため、悪影響を及ぼす硫化物の含有がほとんどない。高濃度、高純度、高回収率で核酸を回収することができる。さらに、核酸回収チップ7は目的核酸バンド5に近接して差し込むため、目的以外の核酸の混入を防ぐことができる。従来の各種回収手段に比べ、はるかに優れた解決法であること明白である。

20 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明に係る核酸回収チップを用いて核酸回収を行う際のアガロースゲルへの挿入法を示す模式的斜視図

【図2】本発明に係る核酸回収チップの模式的斜視図

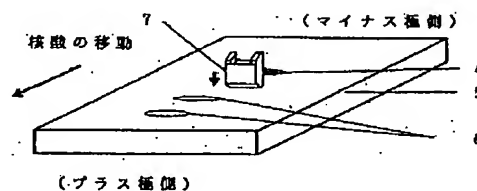
【図3】本発明によるアガロースゲルへゲルから核酸を回収する状態の模式的側面図

【図4】側面に支持体を介設しないで (即ち膜自体の折曲げ加工により) 形成した本発明に係る、核酸回収チップの模式的斜視図

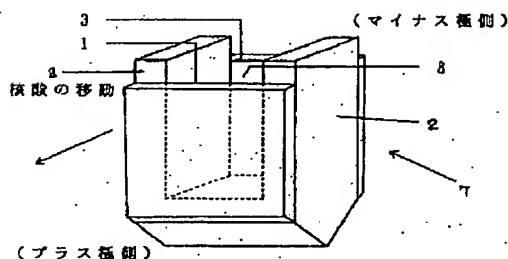
30 【符号の説明】

- 1 核酸が通過できない膜
- 2 支持体
- 3 核酸が通過できる膜
- 4 目的核酸バンド
- 5 アガロースゲル
- 6 目的以外の核酸バンド
- 7 核酸回収チップ
- 8 核酸回収室

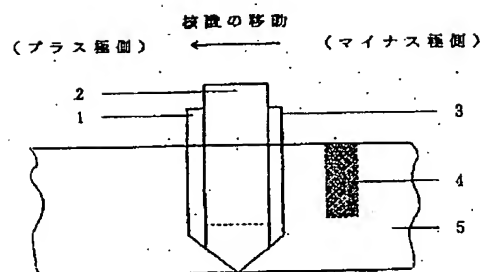
【図1】



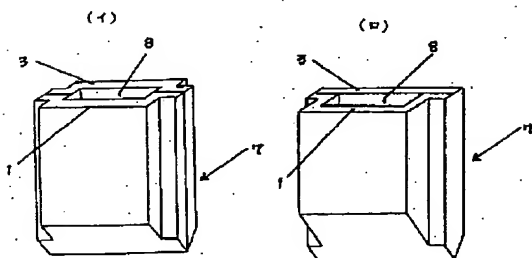
【図2】



【図3】



【図4】



## 【手続補正書】

【提出日】平成8年4月26日

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0004

【補正方法】変更

【補正内容】

【0004】(ロ)電気泳動による溶出法

一端を閉じた透析チューブに目的核酸を含むゲル片を緩衝液とともに入れてもう一端を閉じ、このチューブを電気泳動槽内に電極と平行となるように置き、数時間通電を行うことによって回収する方法(Sambrook, J., et al (1989) Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Press, 6. 28-6. 29、高木康敬編著、遺伝子操作マニュアル、講談社サイエンティフィク)。

## 【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0006

【補正方法】変更

【補正内容】

【0006】(ニ)低融点アガロースを用いる方法

目的核酸を含むゲル片を65℃で融解し、緩衝液を加え

てフェノール抽出を数回行うことによって回収する方法(Sambrook, J., et al (1989) Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Press, 6. 30-6. 31、添田栄一著、生物化学実験法18"核酸の塩基配列決定法", 第33-34頁、学会出版センター)。

## 【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0013

【補正方法】変更

【補正内容】

【0013】本発明に係るチップ7の形状としては、上記性質の異なる二種類の膜3、1が核酸を泳動する方向に相対して設けられることにより構成される(図2、3参照)。この性質の異なる二種類の膜3、1を保持する側面の支持体2の材質は特に規制はない。また、支持体2と二種類の膜3、1の接着乃至取着方法は、熱溶着、接着剤を用いた方法、クリップ止め等が挙げられるが、特に規制はない。なお、前記支持体2を介設しないで膜自体の硬度を利用して折曲げ加工することによりチップを形成することもできる(図4の(イ)、(ロ))。また、両膜3、1間に存在する隙間を核酸回収室8とする。

ため、この回収室に注入する緩衝液の量は、支持体2の厚さと断面積に依存する。支持体2の厚さとしては、回収時にマイクロビベットが挿入できる隙間以上であり、アガロースゲル5の目的核酸バンド付近にチップ7を突き刺す時に目的以外の核酸バンドに触れない程度の厚さであれば良い。好ましくは、支持体2の厚さは0.3～0.6mmである。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0014

【補正方法】変更

【補正内容】

【0014】このチップ7を構成する核酸を通過させることのできる膜3の好ましい形態は、異物（アガロースゲル片）の混入を防ぎ、チップ7をアガロースゲル5から出し入れする時に緩衝液の急激な流入を防ぎ、核酸吸着性のない又は吸着性のほとんどない特徴を持つ膜である。これに適する膜として濾紙、精密濾過膜、限外濾過膜、不織布等が挙げられる。しかし、耐久性や溶出物による汚染等を考慮した場合、医薬品等の濾過に用いられる精密濾過膜や不織布が最も好ましい。核酸吸着性のない又は吸着性のほとんどない膜の材質例として、セルロースアセテート製精密濾過膜を用いることができる。さらにこの精密濾過膜の孔径としては特に規制はないが0.2～1.0μmが好ましい。この孔径は現在市場に出ている主な膜のものであり、この範囲外でもチップ7に用いて核酸を回収することは可能である。また、不織布の材質例としてポリエステル等を用いることができる。この不織布の目付としては特に規制はないが20～40g/m<sup>2</sup>が好ましい。この範囲外でもチップ7に用いて核酸を回収することは可能である。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0017

【補正方法】変更

【補正内容】

【0017】その後、このアガロースゲル5を再び電気泳動装置にセットし、適当な電圧、時間で通電を行う。この操作により、目的核酸はまず、核酸を通過させることのできる膜3を通り抜け、回収室8の緩衝液に移動し、その後核酸を通過させることのできない膜1で移動が停止する。次に、アガロースゲル5からチップ7を取り除き、先の細いマイクロビベット等を用いてチップ7の回収室8から緩衝液を吸い取り、目的核酸を回収するものである。なお、回収量を増加させるためには、回収室8に緩衝液を入れ、再びマイクロビベットで吸い取ることにより増加させることができる。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0020

【補正方法】変更

【補正内容】

【0020】

【試験例1】

＜回収するサンプルの調製＞λDNA/Hind III digestのサンプル(23, 9.42, 6.56, 4.36, 2.32, 2.02, 0.56, 0.13kbpの核酸) (株式会社ニッポンジーン製 Marker 1) 1.0μgを0.7%アガロースゲルによって、100V, 40min, TBE (トリスホウ酸) 緩衝液で電気泳動を行い、その後このゲルをエチジウムブロミド染色しUV照射 (トランスイルミネーター) 下でサンプルの存在を確認した。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0021

【補正方法】変更

【補正内容】

【0021】＜回収方法＞サンプルを電気泳動することによって確認された8種類の核酸バンドの中から、目的核酸バンドを6.56kbとし、本発明チップを用いてこの核酸の回収を行った。始めにチップの回収室にTBE緩衝液20μlを注入しておき、UV照射下で目的核酸バンドを確認しながらチップの透析膜側をプラス極側に向けて、バンドのプラス側にチップがバンドと平行になるように、チップの先端がゲルの底に達するまで突き刺した(図1, 3参照)。その後、このアガロースゲルを100V, 4min再び通電を行った。アガロースゲルからチップを取り除き、先の細いマイクロビベットで回収室の緩衝液を数回出し入れした後(ビベットイング)、緩衝液を全量吸い取り回収液とした。また、回収量を増加させるためには、緩衝液を回収室に入れ、同様にマイクロビベットで吸い取り、先の回収液に加えた。なお、チップに用いた膜はセルロースアセテート膜(東洋濾紙株式会社製, CO45A, 孔径0.45μm)と透析膜(フナコシ株式会社製, CELLULOSEPT3, MWCO 5,000)であり、支持体はPETフィルムを用いた。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0024

【補正方法】変更

【補正内容】

【0024】

【試験例3及び試験例4】

＜試験例3＞試験例1と同様の操作で回収を行ない、但し、緩衝液をTBEからTAE (トリス酢酸) に変えて行った。回収した核酸の収率は、87%であった。

＜試験例4＞試験例1と同様の操作で回収を行ない、チップに用いる膜をセルロースアセテート膜から不織布



(日本バイリーン株式会社製、H-8103、目付30  $\text{g}/\text{m}^2$ 、ポリエステル) に変えて行なった。回収した\* \* 核酸の収率は、93%であった。

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>  
G 0 1 N 33/50

識別記号 庁内整理番号  
9162-4B

F I  
C 1 2 N 15/00

技術表示箇所  
A

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**